

는 것을 또 다른 목적으로 한다.

*Correspond to Paragraph E0016.7*

- 5 따라서, 본 발명은 종래의 장치 및 방법에 하하여 구성적으로 간단한 열거서열 중 특정의 일 방법을 적절함으로써 장치의 소형화 및 열거열과 같은 복잡장치에서의 구현이 용이한 장치 및 장치를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

또한, 본 발명은 높은 안정성을 가진 DNA 증폭효소 뿐만 아니라 높은 안정성을 가지지 않은 DNA 증폭효소도 사용할 수 있는 일 대용 방식의 열거서열 중 특정 방법 및 장치를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

10

그리고, 본 발명은 지도의 온도 변화환경을 없앴으로써 보다 효율적인 열거서열 중 특정 방법 및 장치를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

- 본 발명이 속한 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 명세서의 도면, 설명의 15 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 본 발명의 다른 목적 및 장점을 쉽게 인식할 수 있다.

상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 다음과 같은 새로운 작동원리에 근거한 일 대용 방식의 열거서열 중 특정 방법 및 장치를 제공한다.

- 20 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 증폭효소 연쇄반응을 이용하는 열거서열 중 특정 방법에 있어서,

- 증폭하고자 하는 특정 열거서열을 포함한 주형 DNA, DNA 증폭효소, 삼인산염 및 25 특정 프라이머를 포함하는 시료를 반응용기에 투입하는 단계;

상기 시료 및의 복수의 특정 영역에 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열

로의 끝 부분이 발생하여 디나뉴클레오타이드, 이온쌍, 폴리머리제이션 세 가지 반응 단계를 일어난다는 중간 영역을 통해 시료의 순환이 자연스럽게 일어나게 된다. 이와 같은 구성에 의해 상기 세 가지 중합효소 연쇄반응의 단계들이 순차적으로 반복적으로 일어나게 하는 것이 가능하며, 이에 따라 중합효소 연쇄반응에 의한 DNA 증기서열의 증폭을 달성할 수 있다. 보다 구체적으로 작용 상태를 제시하면 다음과 같다.

*Correspond to the first sentence of Paragraph 0064*

예를 들어, 시료의 한쪽면에 위치한 특정 고온 영역(1)의 온도를 상승시켜 DNA를 단일가닥 DNA로 분리할 수 있는 온도 조건인 90 내지 94°C로 유지함으로써 디나뉴클레오타이드 결합이 이 특정 고온 영역에서 주로 일어나게 한다. 그리고 시료의 상충부에 위치한 특정 저온 영역(2)의 온도를 프라이머의 어닐링 온도 영역인 35 내지 65°C로 유지하여 첫 증폭의 특정 고온 영역에서 디나뉴클레오타이드 DNA가 열 대류에 의해 상충부의 특정 저온 영역으로 이동하게 함으로써 단일가닥 DNA와 이에 상보적인 절지사슬을 갖는 프라이머가 어닐링되어 DNA-프라이머 복합체를 형성하게 한다. 이러한 구성 하에서, 72°C에서 최적 활성도를 가지고 낮은 온도 영역까지 넓은 활성도를 가지는 것으로 알려진 Taq DNA 중합효소를 중합효소를 위하여 사용하는 경우, DNA-프라이머 복합체에 DNA 중합효소가 결합하여 프라이머를 연장(extension)하게 하는 폴리머리제이션 단계는 특정 저온 영역(3) 및 대류 영역(5)의 상충부에서 일어나게 된다. 따라서, 상기 특정 고온 영역(1)에서 상기 디나뉴클레오타이드 단계가 일차적으로 일어나고, 디나뉴클레오타이드 DNA가 프라이머 온점 하에서 열 대류에 의해 상기 특정 저온 영역(2)으로 이동함으로써 어닐링 단계를 이차적으로 일어난다. 이어서, 어닐링에 의해 생성된 DNA-프라이머 복합체가 DNA 중합효소의 존재 하에서 열 대류에 의해 상기 특정 저온 영역(2)과 대류 영역(5)을 통과하는 과정 중에 마지막으로 상기 폴리머리제이션 단계가 일어나게 되며, 이에 따라 상기 디나뉴클레오타이드, 어닐링, 폴리머리제이션의 중합효소 반응의 3 단계가 순차적으로, 그리고 반복적으로 일어나게 되어 시료 DNA의 특정 부위 절지사열의 증폭을 효율적으로 달성하게 된다.

도2에 도시한 바와 같이 반응용기에 들어 있는 시료 내의 2개의 특정 영역에 특수

*Correspond to the second sentence of Paragraph 0064*

도가 감소하게 된다. 따라서, 반응용기의 내경을 조절함으로써 시료와 접촉되는 반응용기의 표면적을 조절하여 상기 열 대류의 속도를 조절할 수 있다. 시료와 반응용기의 벽면과의 접촉력은 또한, 반응용기의 재질과도 밀접한 관계를 가지고 있다. 중합요소 연쇄반응은 수증기에서 진행되므로, 유리 등 전수성 재질에 의하여 용해될런, 솔리드로형된 등 불화 5 의 접착력이 약한 소수성 재질의 반응용기를 사용할 때 대류의 속도는 증가한다. 따라서 중합요소 연쇄반응의 반응속도론적 조건에 맞추어 상기 조건들을 조합하여 반응용기를 구성함으로써, 본 발명의 효율을 더욱 향상시킬 수 있다.

*Correspond to the 6th sentence of Paragraph 0069.1*

- 도3은, 본 발명에 따른 열기시열 중독 장치 중 실시예에 따른 단면도(3a) 및 (3b)를 보여준다. 도3에 도시된 열기시열 중독 장치는 가열장치; 또는 냉각장치; 또는 가열장치 및 냉각장치와 같은 온도 유지 수단을 포함하는 복수의 열원으로 구성된다. 바람직 10 적재는 상기 복수의 열원 사이를 열적으로 차단시키는 단열 수단을 포함하여 구성될 수 있다. 본 실시예는, 시료의 측정 영역과 열적으로 접촉되는 제 1 열원과 제 2 열원으로 구성 되어 있다. 상기 제 1 열원은 열전도성 블록인 제 1 전도성 블록(101)과 제 1 전도성 블 15 록에 열을 공급하는 장치인 전열망의 가열장치(104)로 구성되어 있으며, 반응용기의 전 분개 열적으로 접촉하여 시료의 하층부에 고온 영역을 형성하도록 구성되어 있다. 상기 제 2 열원은 열전도성 블록인 제 2 전도성 블록(102)과 제 2 전도성 블록 내부에 적재 온도 의 물을 순환시켜 제 2 전도성 블록을 적정 온도로 유지시키는 순환형 펌프 수조로 구성 되어 있으며, 상기 제 2 전도성 블록(102)은 반응용기의 상부에 열적으로 접촉하여 시료의 20 상층부에 저온 영역을 형성하도록 구성되어 있다. 상기 제 2 전도성 블록(102)은 펌프 수 조로부터 물을 받아들이는 유입부(105), 상기 유입된 물을 유출하는 유출부 (106), 상기 유입부(105)로 유입된 물을 제 2 전도성 블록(102) 내부로 순환시키기 위한 유체순환로를 포함하고 있으며, 상기 제 2 전도성 블록(102) 내의 유체 순환로는 도3에는 도시되어 있 기 않지만, 상기 제 2 전도성 블록(102)에 열을 고르게 전달하도록 구성되어 있다는 것을 25 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 알 수 있다. 상기 전도성 블록(101, 102)의 재질은 열 전도성이 좋은 구리를 사용하였으며, 상기 제 1 전도성 블록(101)과 상

*Correspond to the 8th sentence of Paragraph 0069.1*

기 제 2 전도성 블록(102)간의 직접적인 열교환을 차단시키기 위해서 양 블록 사이에 단열재(107)가 삽입되어 있다. 그리고, 상기 제 1 전도성 블록(101)과 상기 제 2 전도성 블록(102)은 반응용기를 수용하기 위한 수용부를 가지고 있는데, 상기 수용부는, 상기 제 1 전도성 블록(101)의 한쪽이 막힌 채우부(111)와, 상기 제 2 전도성 블록(102)의 한쪽부(112)와, 상기 단열재(107)의 한쪽부(117)에 의해 형성된 교육부로 구성되어 있다.

*Correspond to Paragraph 00087*

주술하는 <실시예 1>, <실시예 2>, 및 <실시예 3>에서는, 시료의 원충분의 반응 영역이 94℃가 되도록 상기 전열방식 가열장치(104)의 가열 정도를 조절하였고, 시료의 산충분의 반응 영역이 45℃가 되도록 순환형 정온 수조의 물의 온도를 조절하였다.

10

본 발명은 도3에 도시된 임가적일 블록 장치에 한정되는 것은 아니며, 다음의 일 변형예가 있을 수 있다.

*Correspond to the second sentence of Paragraph 00093*

첫째, 상기 전도성 블록(101, 102)의 구성을 변경할 수 있다. 예를 들면, 제 1 전도성 블록(101)은 반응용기의 일부분과 열적으로 접촉시키고, 제 2 전도성 블록(102)은 반응용기의 양쪽과 열적으로 접촉시키되 반응용기의 중간 부분을 공기와 접촉도록 하거나, 제 3의 전도성 블록을 사용하여 반응용기의 중간 부분을 열적으로 접촉시킬 수도 있다. 또한, 도3의 경우와 달리 상기 복수의 전도성 블록으로써 반응용기의 벽을 통하여 시료의 특정 영역으로 열이 전달되게 하는 대신, 시료와 상기 전도성 블록이 직접 접촉하도록 반응용기 벽 하는 구성도 가능하다.

20

둘째, 상기 전도성 블록의 재질을 변경할 수 있다. 도3의 실시예에서는 수의로 전도성 블록(101, 102)을 사용하였지만, 이에 한정되는 것은 아니며 반응용기에 열을 전달할 수 있는 물질은 어떠한 것이어도 가능하다. 예를 들면, 다른 전도성 고체나, 액체 또는 기체와 같은 유체를 상기 전도성 블록과 대체하여 사용할 수 있으며, 시료의 특정 영역을 적외선 등을 사용하여 직접 가열하는 방법을 사용함으로써 전도성 블록(101, 102)의 일부

25

있는 것이므로, 더 상세한 설명은 생략한다.

*Correspond to the last sentence of Paragraph 00977*

도4는 반응용기 내의 시료의 반응용기 바닥으로부터의 높이에 따른 온도 분포도로써, 열 대류를 이용하여 PCR 반응이 일어나는 원리를 보여준다. 열 대류 (thermal convection)는 유체가 온도차에서 비롯된 밀도차로 자연적으로 이동하는 현상이다. 특히 이를 자연대류(natural convection)라 하며, 이는 열표나 프로펠러 등을 이용하여 강제적으로 유체를 이동시키는 강제대류(forced convection)와는 구별된다. 본 명세서에서, 대류는 모두 자연대류를 의미한다. 반응용기 내에서 강제대류가 발생하기 위해서는, 반응용기 내 시료의 상층부의 온도보다 하층부의 온도가 높아야 한다.

*Correspond to the first sentence of Paragraph 00978*

도4에서 알 수 있듯이, 반응용기의 하부의 정육각형 제 1 전도성 블록(101)을 96℃로 유지하고 반응용기의 상부의 정육각형 제 2 전도성 블록(102)을 45℃로 유지하면 경우에, 반응용기 내의 시료에는 고온 영역(도4에서 96℃ 이상 영역), 저온 영역(도4에서 50℃ 부근의 영역), 및 대류 영역(도4에서 온도의 기울기가 존재하는 영역)이 형성된다. 상

기 고온 영역에서 시료는 주로 DNA중합효소 단제를 거치고, 상기 DNA중합효소 단제를 거친 시료는 대류 영역을 통하여 상기 저온 영역으로 이동되어 어닐링 단제를 거치게 되며, 시료가 상기 저온 영역에 있는 동안과 저온영역으로부터 대류 영역으로 들어오는 동안 중합효소 연쇄반응 단제를 거치게 된다. 열 대류에 의한 상기 3 개 영역간의 시료의 순환에 의하여, 상기 3 가지 단제가 순차적이고 반복적으로 수행됨으로써 중합효소 연쇄반응에 의한 증가시열 증폭이 달성되게 된다.

도7은 도6의 표면에 고정화된 DNA 중합효소를 사용한 결과를 보여주고 있다. 본 명세서에서, 고정화된 DNA 중합효소라 하는 고체 상에 활성을 유지한 채 결합되어 있는 DNA 중합효소를 지칭한다. 고정화된 DNA 중합효소를 제조하는 방법은 여러 가지가 있을 수 있으나, 중합효소 연쇄반응의 결과로 주형 DNA의 증가시열이 증폭되어 그 결과를 증폭할 수 있을 정도로 충분히 높은 유지된 고정화된 DNA 중합효소를 제조할 수 있어야 한

다 본 발명에서 사용된 고정화된 DNA 중합효소는, DNA 중합효소의 활성부위를 DNA 기질로 가스장하여 글 표면 위에 공유결합에 의해 고정화시키는 방법으로 출성이 출제 유가된 채로 제조하였다. 본 명세서의 실시 예에 그 구체적인 과정이 설명되어 있는데, 본 발명에서 실시한 결과, 고정화된 효소의 활성은 동량의 용액상 효소에 비하여 약 50 ~ 80%의 수준을 나타내며 중합효소 연쇄반응에 사용할 수 있을 정도의 충분한 활성을 나타내었다. 그러나, 본 발명에서 사용되는 고정화된 DNA 중합효소는 상기 방법에 의하여 고정화된 것뿐만 아니라 다른 방법으로 고정화된 DNA 중합효소라도 사용될 수 있다.

- 10           본 발명 장치의 영거시열 중독 일련된 본 발명에서는 DNA 중합효소를 사용할 때 있어서, 736 중합효소 또는 고온 안정성 효소를 사용하는 외에 클레프나우 프래그먼트 (Klenow fragment) 나 T7 DNA 중합효소와 같이 고온 안정성을 가지지 않은 효소도 사용할 수 있다. 이는 본 발명의 목적을 전체 시료의 온도와 효소의 적응으로 만족적으로 변화하는 것이 아니라, 시료내 특정 영역 별로 온도가 유가되기 때문이다. 즉, 시료의 일부분은 계속 고온 영역으로 유지되는 반면, 시료의 일부분은 계속 낮은 영역으로 유지되고 있으므로
- 15           이러한 저온 영역 또는 저온 영역에 가까운 여러 영역의 상층부에 DNA 중합효소를 고정화함으로써, 고온 안정성을 가지지 않은 효소의 사용이 가능하게 된다.

*[Correspond to the fourth sentence of Paragraph 0020.]*

본 일련된 영거시열 중독 장치를 사용하여, 본 발명의 목적을 달성할 수 있다는 것

- 20           을 다음의 실시예 1, 2, 및 3를 통하여 확인하였다.

## <실시예 1>

### 1. 장치

#### 1.1 반응용기

요약서

본 발명은 구성이 간단하고, 소정의 및 복장장치에서의 구현이 용이하고, 높은 안정성이 가  
 5 된 DNA 중합효소도 사용할 수 있는 열 대류를 이용한 열기시점 중추 장치 및 방법을 제  
 공한다. 본 발명은 상기 시료 내의 복수의 특정 영역에 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는  
 복수의 열원을 집적으로 결합시키거나, 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높  
 은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 온도에 위치  
 하도록 상기 열원을 배치시킴으로써, 중합효소 전체 반응이 효율적으로 일어날 수 있는 온  
 10 도의 공간적 온도 분포를 시료 내에 유지시키는 장치를 포함한다.

*Correspond to the second sentence of Abstract.*